

01/636, 289



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenl gungsschrift**  
⑩ **DE 198 36 098 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 198 36 098.3  
㉑ Anmeldetag: 31. 7. 1998  
㉒ Offenlegungstag: 3. 2. 2000

㉓ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 15/82**  
C 12 N 15/52  
C 12 N 9/00  
C 12 N 5/10  
A 01 H 5/10  
C 12 P 19/04  
C 08 B 30/00  
// A23L 1/0522,B65D  
65/46

DE 198 36 098 A 1

㉔ Anmelder:  
Hoechst Schering AgrEvo GmbH, 13509 Berlin, DE

㉕ Erfinder:  
Landschütze, Volker, Dr., 12203 Berlin, DE

㉖ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE	196 36 917 A1
WO	98 22 604 A1
WO	97 20 936 A1
WO	97 20 040 A1
WO	96 15 248 A1
WO	95 26 407 A1
WO	94 11 520 A2
WO	94 09 144 A1
WO	92 11 382 A1
WO	92 11 375 A1

Datenbank Chemical Abstracts:  
Ref. 127:261734,1997,S.29-38;  
Ref. 126:168218,1996,S.981-991;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

- ㉗ Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, Verfahren zur Herstellung der Pflanzen, ihre Verwendung sowie die modifizierte Stärke
- ㉘ Die vorliegende Erfindung betrifft rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die zwei oder mehr Nukleotidsequenzen enthalten, die am Stärkemetabolismus beteiligte Enzyme kodieren, Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine Stärke synthetisieren, die bezüglich ihres Phosphatgehalts und ihrer Seitenkettenstruktur verändert ist. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren und Wirtszellen, welche die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, die aus den erfindungsgemäßen Verfahren hervorgehenden Pflanzenzellen und Pflanzen, die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

DE 198 36 098 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die zwei oder mehr Nukleotidsequenzen enthalten, die am Stärkemetabolismus beteiligte Enzyme kodieren, Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine Stärke synthetisieren, die bezüglich ihres Phosphatgehalts und ihrer Seitenkettenstruktur verändert ist. Desweiteren betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren und Wirtszellen, welche die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, die aus den erfindungsgemäßen Verfahren hervorgehenden Pflanzenzellen und Pflanzen, die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen beigemessen wird, ist die biotechnologische Forschung um eine Anpassung pflanzlicher Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie bemüht. Um die Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es insofern erforderlich, eine große Stoffvielfalt zur Verfügung zu stellen.

Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide wichtige, nachwachsende Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist. Neben Mais, Reis und Weizen spielt die Kartoffel insbesondere bei der Stärkeproduktion eine wichtige Rolle.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glukosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glukoseketten unterscheiden. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glukoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Verknüpfungen zustande. In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z. B. Mais oder Kartoffel, besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 25% aus Amylosestärke und zu ca. 75% aus Amylopektin-Stärke.

Die molekulare Struktur der Stärke, die zu einem großen Teil durch den Verzweigungsgrad, das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, die durchschnittliche Länge und Verteilung der Seitenketten sowie das Vorhandensein von Phosphatgruppen bestimmt wird, ist ausschlaggebend für wichtige funktionelle Eigenschaften der Stärke bzw. ihrer wässrigen Lösungen. Als wichtige funktionelle Eigenschaften sind hierbei beispielsweise zu nennen, die Löslichkeit, das Retrogradierungsverhalten, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Farbstabilität, die Verkleisterungseigenschaften sowie Binde- und Klebeeigenschaften. Auch die Stärkekorngröße kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein. Für bestimmte Anwendungen ist auch die Erzeugung von hochamylosehaltigen Stärken von besonderem Interesse. Ferner kann eine in Pflanzenzellen enthaltene modifizierte Stärke das Verhalten der Pflanzenzelle unter bestimmten Bedingungen vorteilhaft verändern. Denkbar ist beispielsweise eine Verringerung des Stärkeabbaus während der Lagerung von Stärke-enthaltenden Organen, wie z. B. Samen oder Knollen, vor deren weiterer Verarbeitung, z. B. zur Extraktion der Stärke. Ferner ist es von Interesse, modifizierte Stärken herzustellen, die dazu führen, daß Pflanzenzellen oder pflanzliche Organe, die diese Stärke enthalten, besser zur Weiterverarbeitung geeignet sind, beispielsweise bei der Herstellung von Lebensmitteln wie "Popcorn" oder "Cornflakes" aus Mais oder von Pommes frites, Chips oder Kartoffelpulver aus Kartoffeln. Von besonderem Interesse ist hierbei die Verbesserung der Stärken in der Hinsicht, daß sie ein reduziertes "cold sweetening" aufweisen, d. h. eine verringerte Freisetzung von reduzierenden Zuckern (insbesondere Glucose) bei einer längeren Lagerung bei niedrigen Temperaturen. Gerade Kartoffeln werden häufig bei Temperaturen von 4 bis 8°C gelagert, um den Stärkeabbau während der Lagerung zu minimieren. Die hierbei freigesetzten reduzierenden Zucker, insbesondere Glucose, führen beispielsweise bei der Herstellung von Pommes frites oder Chips zu unerwünschten Bräunungsreaktionen (sogenannte Maillard-Reaktionen).

Die Anpassung der aus Pflanzen isolierbaren Stärke an bestimmte industrielle Verwendungszwecke erfolgt häufig mit Hilfe chemischer Modifikationen, die in der Regel Zeit- und kostenintensiv sind. Es erscheint daher wünschenswert, Möglichkeiten zu finden, Pflanzen herzustellen, die eine Stärke synthetisieren, die in ihren Eigenschaften bereits den spezifischen Anforderungen der verarbeitenden Industrie entsprechen und somit ökonomische und ökologische Vorteile in sich vereinen.

Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht – neben züchterischen Maßnahmen – in der gezielten genetischen Veränderung des Stärkemetabolismus stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Stärkesynthesemodifikation und -abbau (Stärkemetabolismus) beteiligten Enzyme sowie die Isolierung der entsprechenden, für diese Enzyme kodierenden DNA-Sequenzen.

Die biochemischen Synthesewege, die zum Aufbau von Stärke führen, sind im wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthese in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärke-speichernden Geweben die Amyloplasten.

Wichtige an der Stärkesynthese beteiligte Enzyme sind z. B. die Verzweigungsenzyme (branching enzyme), ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärkekorn-gebundene Stärkesynthasen, lösliche Stärkesynthasen, Entzweigungsenzyme (debranching enzyme), Disproportionierungsenzyme, plastidäre Stärkephosphorylasen und die R1-Enzyme.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, weitere bzw. alternative gentechnische Ansätze zur Modifizierung des Stärkemetabolismus in stärkebildenden Pflanzen (z. B. Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne, Bohne, Banane oder Arrowroot) geeignete Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, mittels derer Pflanzenzellen transformiert werden können, so daß die Synthese von veränderten, vorteilhaften Stärkevarietäten ermöglicht wird.

Solche veränderten Stärkevarietäten weisen z. B. Modifikationen in bezug auf ihren Verzweigungsgrad, das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, den Phosphatgehalt, die Stärkekorngröße und/oder die durchschnittliche Länge und Verteilung der Seitenketten (d. h. Seitenkettenstruktur) auf.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Verfahren zur Verfügung zu stellen, die die Herstellung transgener Pflanzen ermöglichen, die eine veränderte (modifizierte) Stärkevarietät synthetisieren.

Überraschenderweise synthetisieren transgene Pflanzen, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen transformiert wurden, eine Stärke, die in der besonderen, erfindungsgemäßen Weise in ihren physikochemischen Eigenschaften und/oder in ihrer Seitenkettenstruktur verändert ist. Hingegen zeigen Stärken, die von transgenen Pflanzen synthetisiert werden, die mit im Stand der Technik bekannten Nukleinsäuremolekülen transformiert wurden, keine erfindungsgemäßen Veränderungen.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, enthaltend

a) eine Nukleotidsequenz codierend für ein Protein mit der Funktion einer löslichen Stärkesynthase III oder Teile besagter Nukleotidsequenz und

b) ein oder mehrere Nukleotidsequenzen, die für ein Protein kodieren, ausgewählt aus der Gruppe A, bestehend aus Proteinen mit der Funktion von Verzweigungsenzymen, ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen, löslichen Stärkesynthasen, Entzweigungsenzymen, Disproportionierungsenzymen, plastidären Stärkephosphorylasen, R1-Enzymen, Amylasen, Glukosidasen, Teilen von Nukleotidsequenzen codierend für Proteine ausgewählt aus der Gruppe A und Nukleinsäuremoleküle, die mit einem der besagten Nukleotidsequenzen oder deren Teilen hybridisiert, vorzugsweise ein Desoxyribonukleinsäure- oder Ribonukleinsäure-Molekül, besonders bevorzugt ein cDNA-Molekül. Besonders bevorzugt ist ein Nukleinsäuremolekül, das mit einem der besagten Nukleotidsequenzen oder deren Teilen spezifisch hybridisiert.

Erfindungsgemäß geeignete Nukleotidsequenzen codierend für ein Protein mit der Funktion einer löslichen Stärkesynthase III sind z. B. aus der WO 96/15248 bzw. dem EMBL Datenbankeintrag X 94400 oder der EP-A-0779363 bekannt. Unter dem Begriff "Nukleotidsequenz codierend für ein Protein mit der Funktion einer löslichen Stärkesynthase III" sind im Sinne der vorliegenden Erfindung insbesondere solche Sequenzen zu verstehen, deren kodierende Sequenz eine Länge von 3000–4500 bp, vorzugsweise 3200–4250 bp, besonders bevorzugt 3400–4000 bp aufweist und deren Homologie zu dem gesamten kodierenden Bereich einer Nukleinsäure codierend für ein Protein mit der Funktion einer Stärkesynthase mindestens 70%, vorzugsweise 80%, besonders bevorzugt 90% und ganz besonders bevorzugt 95% beträgt.

Erfindungsgemäß geeignete Nukleotidsequenzen, die für ein Protein der Gruppe A kodieren, sind beispielsweise für lösliche (Typ I, II oder IV) oder Stärkekorn-gebundene Stärkesynthase-Isoformen beschrieben in Hergersberg, 1988, Dissertation, Universität Köln; Abel, 1995, Dissertation FU Berlin; Abel et al., 1996, Plant Journal 10 (6): 981–991; Visser et al., 1989, Plant Sci. 64: 185–192; von der Leij et al., 1991, Mol. Gen. Genet. 228: 240–248; EP-A-0779363; WO 92/11376; WO 96/15248; WO 97/26362; WO 97/44472; WO 97/45545; Delrue et al., 1992, J. Bacteriol. 174: 3612–3620; Baba et al., 1993, Plant Physiol. 103: 565–573; Dry et al., 1992, The Plant Journal 2,2: 193–202 oder auch in den EMBL Datenbank Einträgen X74160; X58453; X88789; für Verzweigungsenzym-Isoformen (branching enzyme I, Iia, Iib), Entzweigungsenzym-Isoformen (debranching enzyme, Isoamylasen, Pullulanasen) oder Disproportionierungsenzym-Isoformen beispielsweise beschrieben in WO 92/14827; WO 95/07335; WO 95/09922; WO 96/119581; WO 97/22703; WO 97/32985; WO 97/42328; Takaha et al., 1993, J. Biol. Chem. 268: 1391–1396 oder auch in dem EMBL Datenbank Eintrag X83969 und solche für ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, plastidäre Stärkephosphorylase-Isoformen und R1-Enzyme beispielsweise beschrieben in EP-A-0368506; EP-A-0455316; WO 94/28146; DE 196 53 176.4; WO 97/11188; Brisson et al., 1989, The Plant Cell 1: 559–566; Buchner et al., 1996, Planta 199: 64 73; Camirand et al., 1989, Plant Physiol. 89(4 Suppl.) 61; Bhatt & Knowler, J. Exp. Botany 41 (Suppl.) 5 7; Lin et al., 1991, Plant Physiol. 95: 1250–1253; Sonnewald et al., 1995, Plant Mol. Biol. 27: 567–576; DDBJ Nr. D23280; Lorberth et al., 1998, Nature Biotechnology 16: 473–477.

Die erfindungsgemäß geeignet einzusetzenden Nukleotidsequenzen sind pro- oder eukaryontischen Ursprungs, vorzugsweise bakteriellen, pilzlichen oder pflanzlichen Ursprungs.

Der Begriff "Teile von Nukleotidsequenzen" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung Teile der erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleotidsequenzen, die mindestens 15 bp, vorzugsweise mindestens 150 bp, besonders bevorzugt mindestens 500 bp lang sind, jedoch eine Länge von 5000 bp, vorzugsweise 2500 bp nicht überschreiten.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind.

Besonders bevorzugt erfolgt eine "spezifische Hybridisierung", unter den folgenden hoch-stringenten Bedingungen: Hybridisierungspuffer: 2 × SSC; 10 × Denhardt-Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1 : 1 : 1); 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 250 µg/ml Heringssperma-DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS bei einer

Hybridisierungstemperatur: T = 55 bis 68°C,

Waschpuffer: 0,2 × SSC; 0,1% SDS und

Waschtemperatur: T = 40 bis 68°C.

Die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und alleliche Varianten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nukleinsäuremoleküle verstanden, die lang genug sind, um einen Teil der beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Ho-

mologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 60%, vorzugsweise über 70% und besonders bevorzugt über 85%. Die Abweichungen zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen können dabei durch Deletionen, Substitutionen, Insertionen oder Rekombinationen entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nukleinsäuremolekülen oder den durch sie kodierten Proteinen, besteht. Bei den Nukleinsäuremolekülen, die homolog zu den erfindungsgemäßen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen kann es sich um DNA-Moleküle handeln, insbesondere um cDNA- oder genomische Moleküle. Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle RNA-Moleküle sein. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Teile davon können z. B. aus natürlichen Quellen gewonnen sein, durch rekombinante Techniken oder synthetisch hergestellt sein.

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage. Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt, der z. B. chemisch oder biologisch induzierbar sein kann. In Bezug auf die transformierte Pflanze kann der Promotor – wie auch die Nukleotidsequenz – homolog oder heterolog sein. Geeignete Promotoren sind z. B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus für eine konstitutive Expression, der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., 1989, EMBO J. 8: 23–29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z. B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7943–7947; Stockhaus et al., 1989, EMBO J. 8: 2445–2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais.

Eine das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül abschließende Terminationssequenz kann der korrekten Beendigung der Transkription dienen, sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., 1989, EMBO J. 8: 23–29) und sind beliebig austauschbar.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können für die Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen verwendet werden, die in der Aktivität der löslichen Stärkesynthase III sowie mindestens eines weiteren Enzyms, des Stärkemetabolismus erhöht oder erniedrigt sind. Hierfür werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in geeignete Vektoren eingebracht, mit den notwendigen regulatorischen Nukleinsäure-Sequenzen für eine effiziente Transkription in pflanzlichen Zellen versehen und in pflanzliche Zellen eingeführt. Es besteht zum einen die Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Inhibierung der Synthese der endogenen löslichen Stärkesynthase III und/oder mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in den Zellen zu verwenden. Dies kann mit Hilfe von antisense-Konstrukten, in vivo Mutagenese, eines auftretenden Cosuppressionseffektes oder mit Hilfe von in entsprechender Weise konstruierten Ribozymen erreicht werden. Andererseits können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Expression der löslichen Stärkesynthase III und/oder mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in Zellen transgener Pflanzen verwendet werden und so zu einer Steigerung der Aktivität der jeweils exprimierten Enzyme in den Zellen führen.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Inhibierung der Synthese der endogenen löslichen Stärkesynthase III und der Überexpression mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in den Zellen zu verwenden. Schließlich können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auch zur Expression der löslichen Stärkesynthase III und der Inhibierung mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in Zellen transgener Pflanzen verwendet werden. Die beiden letztgenannten Ausführungsformen der Erfindung führen so zu einer gleichzeitigen Hemmung und Steigerung der Aktivitäten der jeweils inhibierten bzw. exprimierten Enzyme in den Zellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül.

Der Begriff "Vektor" umfaßt Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten und zur Transformation von Zellen geeignet sind. Vorzugsweise sind derartige Vektoren zur Transformation pflanzlicher Zellen geeignet. Besonders bevorzugt erlauben sie die Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, gegebenenfalls zusammen mit flankierenden regulatorischen Regionen, in das Genom der Pflanzenzelle. Beispiele hierfür sind binäre Vektoren, wie pBinAR oder pBinB33, die bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer eingesetzt werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform zeichnet sich der erfindungsgemäße Vektor dadurch aus, daß die Nukleotidsequenz, die für ein Protein mit der Funktion einer löslichen Stärkesynthase III codierend oder deren Teile in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zeichnet sich der erfindungsgemäße Vektor dadurch aus, daß die Nukleotidsequenz, die für ein oder mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A oder Teilen davon kodiert, in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.

In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zeichnet sich der erfindungsgemäße Vektor dadurch aus, daß die Nukleotidsequenz, die für mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A oder Teilen davon kodiert, teilweise in sense-Richtung und teilweise in anti-sense-Richtung vorliegt.

Der erfindungsgemäße Vektor ist ganz besonders bevorzugt mit regulatorischen Elementen verknüpft, die die Expres-

sion, d. h. z. B. die Transkription und Synthese einer RNA, die im Fall einer in sense-Richtung vorliegenden Nukleotidsequenz translatierbar ist, in einer pro- oder eukaryontischen Zelle gewährleisten.

Darüberhinaus ist es möglich, mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe z. B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen einzuführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit gegebenenfalls veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei denen durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'-Ende der kodierenden DNA-Sequenzen erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionen am 5'-Ende der DNA-Sequenz ist es beispielsweise möglich, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Entfernen der entsprechenden Transit- oder Signal-Sequenzen nicht mehr in ihrem ursprünglichen (homologen) Kompartiment, sondern im Cytosol, oder aufgrund der Addition von anderen Signalsequenzen in einem oder mehreren anderen (heterologen) Kompartimenten lokalisiert sind.

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z. B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten  $K_M$ - oder  $k_{cat}$ -Wert besitzen oder die nicht mehr den normalerweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Teile dieser Sequenzen in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von molekularbiologischen Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, loc.cit.) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder linker ange-setzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen eine Sequenzanalyse, eine Restriktionsanalyse und ggf. weitere biochemischmolekularbiologische Methoden durchgeführt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, vorzugsweise bakterielle oder pflanzliche Zellen (z. B. aus E.coli, Agrobacterium, Solanaceae, Poideae, Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne, Bohne, Banane oder Arrowroot), die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält oder die von einer Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert wurde, abstammt.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, vorzugsweise bakterielle oder pflanzliche Zellen (z. B. aus E.coli, Agrobacterium, Solanaceae, Poideae, Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne, Bohne, Banane oder Arrowroot), die neben einem rekombinanten Nukleinsäuremolekül codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase, ein oder mehrere weitere rekombinante Nukleinsäuremoleküle enthält, die für ein Protein ausgewählt aus der Gruppe A kodieren, oder deren Teilen oder mit diesen Nukleinsäuremolekülen hybridisierende Nukleotidsequenzen.

Neben der Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle lassen sich die erfindungsgemäßen Wirtszellen auch durch sukzessive Transformation herstellen (sog. "Supertransformation"), indem einzelne Nukleotidsequenzen oder Vektoren enthaltend Nukleotidsequenzen, die für ein Protein codieren mit der Funktion von löslichen Stärkesynthasen III, Verzweigungsenzymen, ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen, löslichen Stärkesynthasen I und/oder II, Entzweigungsenzymen, Disproportionierungsenzymen, plastidären Stärkephosphorylasen, R1-Enzymen, Teilen davon, sowie Nukleinsäuremoleküle, die mit einem der besagten Nukleotidsequenzen oder deren Teilen hybridisiert, in mehreren, aufeinanderfolgenden Transformationen der Zellen eingesetzt werden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, dadurch gekennzeichnet, daß ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül oder ein erfindungsgemäßer Vektor in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ist es möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von Pflanzen einzugreifen und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die beispielsweise in bezug auf Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallisation oder auch in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur, Transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit oder Reaktivität im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Durch eine Erhöhung der Aktivität von am Stärkemetabolismus beteiligten Proteinen, beispielsweise durch Überexpression entsprechender Nukleinsäuremoleküle, oder durch die Bereitstellung von Mutanten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen und/oder unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten in bezug auf ihre Aktivität besitzen, besteht die Möglichkeit der Ertragssteigerung in entsprechend gentechnisch veränderten Pflanzen. Durch die Steigerung der Aktivität einer oder mehrerer am Stärkemetabolismus beteiligten Proteinen in bestimmten Zellen der stärkespeichernden Gewebe transformierter Pflanzen wie z. B. in der Knolle bei der Kartoffel oder in dem Endosperm von Mais oder Weizen kann es zu einer besonders ausgeprägten Ertragssteigerung kommen. Die wirtschaftliche Bedeutung und die Vorteile dieser Möglichkeiten des Eingriffs in den Stärkemetabolismus liegen auf der Hand.

Bei der Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit,

daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment (Cytosol, Vakuole, Apoplast, Plastiden, Mitochondrien) zu erreichen, muß die die Lokalisation gewährleistende Transit- oder Signalsequenz ggf. deletiert (entfernt) werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

Die Herstellung von Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität eines am Stärkemetabolismus beteiligten Proteins kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressionseffektes, in vivo Mutagenese oder die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die eines der am Stärkemetabolismus beteiligten Proteine codieren, unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, vorzugsweise durch Expression eines antisense-Transkripts.

Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein am Stärkemetabolismus beteiligtes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile eine Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise von mindestens 100-500 bp, und insbesondere von über 500 bp aufweisen. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise kürzer als 2500 bp sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65% sein. Die Verwendung von Sequenzen mit einer Homologie von 75% und insbesondere 80% ist zu bevorzugen.

Die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Proteinen in Zellen ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1-0 321 201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurden z. B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-338).

Ferner kann die Verringerung der am Stärkemetabolismus beteiligten Proteine der Gruppe A in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen auch durch die sogenannte "in vivo-Mutagenese" erreicht werden, bei der durch Transformation von Zellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Zellen eingeführt wird (Kipp P. B. et al., Poster Session beim "5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology", 21-27, September 1997, Singapore; R. A. Dixon und C. J. Amtzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15 (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung WO 95/15972; Kren et al., Hepatology 25 (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273 (1996), 1386-1389).

Ein Teil der DNA-Komponente des hierbei verwendeten RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer Nucleinsäuresequenz eines endogenen Proteins der Gruppe A, weist jedoch im Vergleich zur Nucleinsäuresequenz des endogenen Proteins der Gruppe A eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nucleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination kann die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder heterologen Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität des am Stärkemetabolismus beteiligten Proteins der Gruppe A.

Alternativ kann die Verringerung der am Stärkemetabolismus beteiligten Enzymaktivitäten in den Pflanzenzellen durch einen Cosuppressionseffekt erfolgen. Dieses Verfahren ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621) und anderen Quellen.

Zur Inhibierung der Synthese mehrerer an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme in den transformierten Pflanzen können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Enzyme codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden, so daß die Synthese der betreffenden Proteine in etwa gleichem oder unterschiedlichem Ausmaß inhibiert wird. Für die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es im Prinzip nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 25 kb, vorzugsweise von 15 kb nicht überschreiten.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ist es möglich, Pflanzenzellen zu transformieren und die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in klassische Mutanten eingebracht werden, die in bezug auf ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defizient oder defekt sind (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können sich z. B. auf folgende Proteine beziehen: Stärkekomplexbundene (GBSS I) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I, II, III und IV), Verzweigungsenzyme (BE I, IIa und IIb), "Debranching"-Enzyme (R-Enzyme, Isoamylasen, Pullulanasen), Disproportionierungsenzyme und plastidäre Stärkephosphorylasen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren, die mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül oder Vektor transformiert wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig transformierten Zellen abstammen. Die erfindungsgemäßen Zellen enthalten ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, wobei dieses vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor. Die erfindungsgemäßen Zel-

len lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d. h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die Zellen eingeführten Nukleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden insbesondere dadurch unterscheiden, daß diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind) an denen sie natürlicherweise nicht vorkommt (vorkommen). Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

Bevorzugt sind solche erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, in denen die Enzymaktivität einzelner, am Stärkemetabolismus beteiligter Enzyme zu mindestens 10%, besonders bevorzugt zu mindestens 30% und ganz besonders bevorzugt um mindestens 50% erhöht oder erniedrigt ist.

Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, so weisen die transgenen Pflanzenzellen Transkripte der eingeführten erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachweisen. Beispielsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen ein oder mehrere Proteine, die durch ein eingeführtes erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül codiert werden. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Ist das eingeführte erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, können die erfindungsgemäßen Zellen von natürlicherweise auftretenden beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression erfindungsgemäßer Nukleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die transgenen Pflanzenzellen enthalten z. B. mehr oder weniger Transkripte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. "Mehr" bzw. "weniger" bedeutet dabei vorzugsweise mindestens 10% mehr bzw. weniger, bevorzugt mindestens 20% mehr bzw. weniger und besonders bevorzugt mindestens 50% mehr bzw. weniger Transkripte als entsprechende nicht-transformierte Zellen. Vorzugsweise weisen die Zellen ferner eine entsprechende (mindestens 10%, 20% bzw. 50%ige) Steigerung bzw. Verminderung des Gehalts an erfindungsgemäßem Protein auf. Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden.

Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen durch Regeneration von ganzen Pflanzen aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Spezies handeln, d. h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d. h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise sind dies stärke-speichernde Pflanzen, wie z. B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sagó etc.), Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne oder Arrowroot.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge, Kalli, Protoplasten, Zellkulturen etc.

Durch die Veränderung der enzymatischen Aktivitäten der in den Stärkemetabolismus involvierten Enzyme kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Pflanzen.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E. coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E. coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analyseverfahren zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt (Sambrook et al. loc. cit.). Nach jeder Manipulation kann die Plasmid-DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, mittels Polyethylenglykol (PEG), die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten (Gene Transfer to Plants, S. 24-29, eds.: Potrykus, I. and Spangenberg, G., Springer Verlag Berlin Heidelberg 1995).

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide bzw. DNA gestellt. Es können einfache Plasmide wie z. B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist jedoch die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einföhrungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z. B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuföhrnden Genen verbunden werden.



Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. (1978) *Mol. Gen. Genet.* 163: 181–187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium sollte ein Plasmid, das eine vir-Region trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: *The Binary Plant Vector System* Offsetdrukkerij Kanters B. V., Alblasserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., *Crit. Rev. Plant. Sci.*, 4: 1–46 und An et al. (1985) *EMBO J.* 4: 277–287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z. B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z. B. Willmitzer, L., 1993 *Transgenic plants*. In: *Biotechnology. A Multi-Volume Comprehensive Treatise* (H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627–659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 491–506; Hiei et al., *Plant J.* 6 (1994), 271–282).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes, die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z. B. WO 95/06128, EP 0 513 849; EP 0 465 875). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. (*Bio/Technology* 7 (1989), 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer in vitro Kultivierungszeit von 7 bis 8 Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktivität aufweisen. Prioli und Söndahl (*Bio/Technology* 7 (1989), 589) beschreiben ebenfalls die Regeneration und die Gewinnung fertiler Mais-Pflanzen aus Mais-Protoplasten.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinothricin u. a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81–84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Merkmale.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Merkmale erhalten geblieben sind.

Ebenfalls ist ein weiterer Erfindungsgegenstand ein Verfahren zur Herstellung von Stärke in an sich bekannter Weise, worin erfindungsgemäße Pflanzenzellen, Pflanzen, Pflanzenteile oder Vermehrungsmaterial verarbeitet bzw. in das Verfahren integriert werden.

Die erfindungsgemäße Stärke zeichnet sich in einer bevorzugten Ausführungsform dadurch aus, daß sie einen im Vergleich zu einer Stärke, die aus einer nicht-transformierten Zelle oder Pflanze (d. h. dem Wildtyp) erhältlich ist, einen um mindestens 30%, vorzugsweise mindestens 50%, besonders bevorzugt mindestens 70% und ganz besonders bevorzugt mindestens 90% verminderten Phosphatgehalt aufweist und deren Glukan-Anteil (vgl. Fraktion 3 in Bsp. Nr. 12) nach Isoamylase-Behandlung im Ausschlußvolumen eines HPLC-Säulensystems bestehend aus 2 nacheinandergeschalteten TSK-Gel 2000SW-Säulen und einer TSK-Gel 3000SW-Säule in 10 mM Natriumacetat pH 3,0 (bei einer Flußrate von 0,35 ml/min wie in Beispiel Nr. 12 ausgeführt) um mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 150%, besonders bevorzugt mindestens 300% und ganz besonders bevorzugt mindestens 500% erhöht ist.

In einer weiteren Ausführungsform zeichnet sich die erfindungsgemäße Stärke dadurch aus, daß sie einen im Vergleich zu einer Stärke, die aus einer nicht transformierten Zelle oder Pflanze (d. h. dem Wildtyp) erhältlich ist, einen um mindestens 10%, vorzugsweise mindestens 30% und besonders bevorzugt mindestens 50% erhöhten Phosphatgehalt aufweist und deren Glukan-Anteil (vgl. Fraktion 3 in Bsp. Nr. 12) nach Isoamylase-Behandlung im Ausschlußvolumen eines HPLC-Säulensystems bestehend aus 2 nacheinandergeschalteten TSK-Gel 2000SW-Säulen und einer TSK-Gel



3000SW-Säule in 10 mM Natriumacetat pH 3,0 (bei einer Flußrate von 0,35 ml/min wie in Beispiel Nr. 12 ausgeführt) um mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 150%, besonders bevorzugt mindestens 300% und ganz besonders bevorzugt mindestens 500% erhöht ist.

Verfahren zur Extraktion der Stärke aus Pflanzen oder aus stärke-speichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Verfahren zur Extraktion von Stärke aus Maissamen sind z. B. in Eckhoff et al. (Cereal Chem. 73 (1996) 54-57) beschrieben. Die Extraktion von Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das sogenannte "wet milling" erreicht. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen stärke-speichernden Pflanzen beschrieben, z. B. in "Starch: Chemistry and Technology" (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum-Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichtrockner.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls eine Stärke, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist.

Noch ein weiterer Erfindungsgegenstand ist auch die Stärke, die aus einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle, Pflanze, deren Vermehrungsmaterial oder einem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich ist.

Zu einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zählt auch die industrielle Verwendung der erfindungsgemäßen Stärke zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.

Die erfindungsgemäße Stärke kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignet sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Die Einsatzmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Stärke lassen sich grundsätzlich in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glukose und Glukosebausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Von Bedeutung kann hier die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens sein, wie es gegenwärtig im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglukosidase verläuft. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z. B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die erfindungsgemäße Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet werden kann, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

## 1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z. B. anorganischen oder organischen Ionen.

## 2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich wird Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung von Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindeung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsmittel und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

### 2.1. Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden. Auf die Oberflächenstärke entfällt mit 80% des Verbrauchs die mit Abstand größte Stärkemenge, 8% werden als Strichstärke, 7% als Massestärke und 5% als Sprühstärke eingesetzt. Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißgrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfluß von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

## 2.2. Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich von Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90% der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

## 2.3. Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d. h. als Hilfsstoff zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufreistung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettenmitteln für Nähgarne.

## 2.4. Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung von Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

## 2.5. Bodenstabilisation

Ein mengenmäßig begrenzter Markt für Stärkeprodukte bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

## 2.6. Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So werden Stärken zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt.

## 2.7. Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie werden Stärken als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt. Weiterhin dienen Stärken als Tabletzensprengmittel, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für Stärke liegt bei Zahnpasta.

## 2.8. Stärkezusatz zu Kohle und Brikett

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6%, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5%. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

## 2.9. Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

## 2.10. Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit

eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist. Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

## 2.11. Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie wird Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

## 2.12. Herstellung von Lederersatzstoffe

Eine weitere Absatzmöglichkeit von modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

## 2.13. Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung von Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyäthylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Kocpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem "master batch" kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyäthylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyäthylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wäßrigen Farben erreicht werden. Gegenwärtige Nachteile betreffen die ungenügende Transparenz, die verringerte Zugfestigkeit sowie eine verringerte Dehnbarkeit.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung von Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50% herzustellen. Des weiteren sind Stärke/ Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögens Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z. B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz von neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallisation, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur, Transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Tau-stabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Verfahren kann zum einen die Eigenschaften der z. B. aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Veränderungen nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können jedoch auch durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch Hitze- und Druckbehandlung, Behandlung mit organischen oder anorganischen Säuren, enzymatische Behandlung, Oxidationen und Veresterungen, welche z. B. zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Desweiteren können ein- oder mehrwertige Alkohole in Gegenwart starker Säuren zur Erzeugung von Stärkeethern eingesetzt werden, so daß Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether, vernetzte Stärken oder Stärke-Pfropf-Polymerisate resultieren.

Eine Verwendung der erfindungsgemäßen Stärken liegt in der industriellen Anwendung, vorzugsweise für Lebensmit-

tel oder der Herstellung von Verpackungsmaterialien und Einwegartikeln.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Illustrierung der Erfindung und stellen in keiner Weise eine Einschränkung dar.

5 Verwendete Abkürzungen

BE branching enzyme (Verzweigungsenzym)  
bp Basenpaar  
GBSS granule bound starch synthase (Stärke Korn-gebundene Stärkesynthase)  
10 IPTG Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalacto-Pyranosid  
SS soluble starch synthase (lösliche Stärkesynthase)  
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid.

In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen

- 15 20  $\times$  SSC  
175,3 g NaCl  
88,2 g Natrium-Citrat  
ad 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O  
20 pH 7,0 mit 10 N NaOH
- Puffer A  
50 mM Tris-HCl pH 8,0  
2,5 mM DTT  
25 2 mM EDTA  
0,4 mM PMSF  
10% Glycerin  
0,1% Natriumdithionit
- 30 Puffer B  
50 mM Tris-HCl pH 7,6  
2,5 mM DTT  
2 mM EDTA
- 35 Puffer C  
0,5 M Natriumcitrat pH 7,6  
50 mM Tris-HCl pH 7,6  
2,5 mM DTT  
2 mM EDTA
- 40 10  $\times$  TBS  
0,2 M Tris-HCl pH 7,5  
5,0 M NaCl
- 45 10  $\times$  TBST  
10  $\times$  TBS  
0,1% (v/v) Tween 20
- Elutionspuffer  
50 25 mM Tris pH 8,3  
250 mM Glycin
- Dialysepuffer  
50 mM Tris-HCl pH 7,0  
55 50 mM NaCl  
2 mM EDTA  
14,7 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,5 mM PMSF
- 60 Proteinpuffer  
50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2  
10 mM EDTA  
0,5 mM PMSF  
14,7 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol.

65

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 stellt ein schematisches RVA-Temperaturprofil (Viskosität vs. Zeit [min]) dar mit den viskosimetrischen Para-

metern T = Verkleisterungstemperatur, Temperatur zum Zeitpunkt des Verkleisterungsbeginns; Max bezeichnet die maximale Viskosität; Min bezeichnet die minimale Viskosität; Fin bezeichnet die Viskosität am Ende der Messung; Set ist die Differenz ( $\Delta$ ) aus Min und Fin (Setback).

Fig. 2 zeigt rechts die mittels HPAEC-PAC (Spannung [mv] vs. Zeit [min]) und links die mittels Gelpermeationschromatographie (Ladung [nC] vs. Zeit [min]) ermittelten Seitenkettenverteilung der Amylopektin-Proben.

A = Kontrolle (wildtyp, Nr. 1); B = (asSSII, Nr. 7); C = (asSSIII, Nr. 8);

D = (asSSII asSSIII, Nr. 13); E = (asSSII asSSIII, Nr. 14).

Die in der Figurenbeschreibung in Klammern genannten Nummern beziehen sich auf die Numerierung der in Tabelle 1 und 2 beschriebenen Stärkeproben.

In den Beispielen wurden die folgenden Methoden verwendet:

### 1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung in E.coli wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR Hyg (Höfgen & Willmitzer, 1990, Plant Sci. 66: 221–230) und pBinB33-Hyg kloniert.

### 2. Bakterienstämme und Plasmide

Für den Bluescript-Vektor p Bluescript II KS (Stratagene) und für die pBinAR Hyg- und pBinB33 Hyg-Konstrukte wurde der E.coli-Stamm DH5a (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die in vivo excision wurde der E. coli-Stamm XL1-Blue verwendet.

#### pBinAR

Das Plasmid pBinAR ist ein Derivat des binären Vektorplasmids pBin19 (Bevan, 1984), das folgendermaßen konstruiert wurde:

Ein 529 bp langes Fragment, das die Nukleotide 6909–7437 des 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus umfaßt, wurde als EcoRI/KpnI-Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al., 1986) isoliert und zwischen die EcoRI- und KpnI-Schnittstellen des Polylinkers von pUC18 ligiert und wurde Plasmid pUC18-35S bezeichnet. Aus dem Plasmid pAGV40 (Herrera-Estrella et al., 1983) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen HindIII und PvuII ein 192 bp langes Fragment isoliert, DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al. 1984) umfaßt (Nukleotide 11749–11939). Nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle wurde das Fragment zwischen die SphI- und HindIII-Schnittstellen von pUC18-35S ligiert und wurde Plasmid pA7 bezeichnet. Desweiteren wurde der gesamte Polylinker enthaltend den 35S-Promotor und ocs-Terminator mit EcoRI und HindIII herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen pBin19 ligiert. Dabei entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990).

#### pBinB33

Der Promotor des Patatin Gens B33 aus Solanum tuberosum (Rocha-Sosa et al., 1989) wurde als Dral-Fragment (Nukleotide -1512- +14) in den mit Sst I geschnittenen Vektor pUC19, dessen Enden mit Hilfe der T4-DNA Polymerase geglättet worden waren, ligiert. Daraus entstand das Plasmid pUC19-B33. Aus diesem Plasmid wurde der B33-Promotor mit EcoRI und SmaI herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33.

#### pBinAR-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pA7 (vgl. Beschreibung des Vektors pBinAR) wurde das EcoRI-HindIII Fragment umfassend den 35S-Promotor, den ocs-Terminator sowie den zwischen 35S-Promotor und ocs-Terminator gelegenen Teil des Polylinker in das entsprechend geschnittene pBin-Hyg Plasmid gesetzt.

#### pBinB33-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pBinB33 wurde das EcoRI-HindIII Fragment umfassend den B33-Promotor, einen Teil des Polylinkers sowie den ocs-Terminator herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin-Hyg ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33-Hyg.

### 3. Transformation von Agrobacterium tumefaciens

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen & Willmitzer (1988, Nucleic Acids Res. 16: 9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim & Doly (1979, Nucleic Acids Res. 7: 1513–1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

### 4. Transformation von Kartoffeln

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen (Solanum tuberosum L.cv. Desiree, Vereinigte Saatzuchten eG, Ebstorf) wurde mit Hilfe des Agrobacterium tumefaciens-Stammes C58C1 durchgeführt (Dietze et al. (1995) in

Gene Transfer to Plants. S. 24–29, eds.: Pottkyus, I. and Spangenberg, G., Springer Verlag, Deblaere et al., 1985, Nucl. Acids Res. 13: 4777–4788).

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur wurden in 10 ml MS-Medium (Muras-  
hige & Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15: 473) mit 2% Saccharose gelegt, welches 50 ml einer unter Selektion gewachse-  
nen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 3–5 minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere  
Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glu-  
kose, 5 mg/l Naphthylessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80.%  
Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-  
Medium mit 1,6% Glukose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 mg/l Naphthylessigsäure, 20 mg/l Giberellinsäure, 250 mg/l, Cla-  
foran, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80.% Bacto Agar gelegt.

## 5. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen wurden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen gehalten:

Lichtperiode 16 h bei 25000 Lux und 22°C  
Dunkelperiode 8 h bei 15°C  
Luftfeuchte 60%.

## 6. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der  
Firma Boehringer Mannheim (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## 7. Bestimmung der Stärkesynthase-Aktivität

Die Bestimmung der Stärkesynthaseaktivität erfolgte durch Bestimmung des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Glukose aus ADP [ $^{14}\text{C}$ -  
Glukose] in ein in Methanol/KCl unlösliches Produkt wie beschrieben in Denyer & Smith, 1992, *Planta* 186: 609–617.

## 8. Nachweis von löslichen Stärkesynthasen im nativen Gel

Zum Nachweis der Aktivität löslicher Stärkesynthasen durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese wurden Gewe-  
beprobe von Kartoffelknollen in 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 2,5 mM EDTA, 10% Glycerin und 0,4 mM  
PMSF aufgeschlossen. Die Elektrophorese wurde in einer MiniProtein II Kammer (BioRAD) durchgeführt. Die Mono-  
merkonzentration der 1,5 mm dicken Gele war 7,5% (w/v), als Gel- und Laufpuffer diente 25 mM Tris-Glycin pH 8,4.  
Gleiche Mengen an Proteinextrakt wurden aufgetragen und für 2 h bei 10 mA je Gel aufgetrennt.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Aktivitäts-Gele in 50 mM Tricine-NaOH pH 8,5, 25 mM Kaliumacetat,  
2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM ADP-Glukose, 0,1% (w/v) Amylopektin und 0,5 M Natriumcitrat. Gebildete Glukane  
wurden mit Lugolscher Lösung angefärbt.

## 9. Stärkeanalytik

Die von den transgenen Kartoffelpflanzen gebildete Stärke wurde durch folgende Methoden charakterisiert:

### a) Bestimmung des Amylose/Amylopektinverhältnisses in Stärke aus Kartoffelpflanzen

Stärke wurde nach Standardmethoden aus Kartoffelpflanzen isoliert und das Verhältnis Amylose zu Amylopektin nach  
der von Hovenkamp-Hermelink et al. beschriebenen Methode (*Potato Research* 31 (1988) 241–246) bestimmt.

### b) Bestimmung des Phosphatgehaltes

In der Kartoffelstärke können einige Glucoseeinheiten an den Kohlenstoffatomen der Position C2, C3 und C6 phos-  
phoryliert sein. Zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades an der C6-Position der Glucose wurden 100 mg Stärke in  
1 ml 0,7 M HCl für 4 Stunden bei 95°C hydrolysiert (Nielsen et al. (1994) *Plant Physiol.* 105: 111–117). Nach Neutrali-  
sation mit 0,7 M KOH wurden zur Glucose-6-phosphat-Bestimmung 50 ml des Hydrolysats einem optisch-enzymati-  
schen Test unterzogen. Die Änderung der Absorption des Testansatzes (100 mM Imidazol/HCl; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,4 mM  
NAD; 2 units Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*; 30°C) wurde bei 334 nm verfolgt.

Die Bestimmung des Gesamtphosphats erfolgte wie in Ames, 1996, *Methods in Enzymology* VIII, 115–118 beschrie-  
ben.

### c) Analyse der Seitenketten des Amylopektins

Zur Analyse der Verteilung und Länge der Seitenketten in den Stärkeproben wurde 1 ml einer 0,1%igen Stärkelösung  
mit 0,4 U Isoamylase (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Ireland) über Nacht bei 37°C in 100 mM Na-citrat-  
Puffer, pH 3,5 verdaut.

Die weitere Analyse erfolgte, sofern nicht anders erwähnt, entsprechend den Angaben von Tomlinson et al., (1997),  
*Plant J.* 11: 31–47.

## d) Korngrößenbestimmung

Die Korngrößenbestimmung wurde mit einem Fotosedimentometer des Typs "Lumosed" der Firma Retsch GmbH, Deutschland, durchgeführt. Hierfür wurden 0,2 g Stärke in ca. 150 ml Wasser suspendiert und sofort vermessen. Das vom Hersteller mitgelieferte Programm berechnete den mittleren Durchmesser der Stärkekörner auf der Annahme einer durchschnittlichen Dichte der Stärke von 1,5 g/l.

## e) Verkleisterungseigenschaften

Die Verkleisterungs- bzw. Viskositätseigenschaften der Stärke wurden mit einem Viskograph E der Firma Brabender oHG, Deutschland, oder mit einem Rapid Visco Analyser, Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien, aufgezeichnet. Bei Verwendung des Viskographen E wurde eine Suspension von 30 g Stärke in 450 ml Wasser folgendem Heizprogramm unterzogen: aufheizen von 50°C auf 96°C mit 3°/min., 30 Minuten konstant halten, abkühlen auf 30°C mit 3°/min. und abermals 30 Minuten konstant halten. Das Temperaturprofil lieferte charakteristische Verkleisterungseigenschaften.

Bei der Messung mittels des Rapid Visco Analysers (RVA) wurde eine Suspension von 2 g Stärke in 25 ml Wasser folgendem Heizprogramm unterzogen: 60 s bei 50°C suspendieren, aufheizen von 50°C auf 95°C mit 12°/min., 2,5 Minuten konstant halten, abkühlen auf 50°C mit 12°C/min. und abermals 2 Minuten konstant halten. Das RVA-Temperaturprofil lieferte die viskosimetrischen Parameter der untersuchten Stärken für die maximale (Max) und Endviskosität (Fin), die Verkleisterungstemperatur (T), die nach der maximalen Viskosität auftretende minimale Viskosität (Min) sowie die Differenz aus minimaler und Endviskosität (Setback, Set) (vgl. Tabelle 1 und Fig. 1).

## f) Bestimmung der Gelfestigkeit

Zur Bestimmung der Gelfestigkeit mittels eines Texture Analyser wurden 2 g Stärke in 25 ml Wasser verkleistert (vgl. Messung mittels RVA) und anschließend 24 h lang bei 25°C luftdicht verschlossen gelagert. Die Proben wurden unter der Sonde (runder Stempel) eines Texture Analysers TA-XT2 (Stable Micro Systems) fixiert und die Gelfestigkeit mit folgenden Parameter-Einstellungen bestimmt:

Test-Geschwindigkeit: 0,5 mm  
Eindringtiefe: 7 mm  
Kontaktfläche (des Stempels): 113 mm<sup>2</sup>  
Druck/Kontaktfläche: 2 g

## 10. Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose

Zur Bestimmung des Glucose-, Fructose- bzw. Saccharosegehalts wurden kleine Knollenstücke (Durchmesser ca. 10 mm) von Kartoffelknollen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 30 min bei 80°C in 0,5 ml 10 mM HEPES, pH 7,5; 80% (Vol./Vol.) Ethanol extrahiert. Der Überstand, der die löslichen Bestandteile enthält, wurde abgenommen und das Volumen bestimmt. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Menge an löslichen Zuckern verwendet. Die quantitative Bestimmung von löslicher Glucose, Fructose und Saccharose wurde in einem Ansatz mit folgender Zusammensetzung durchgeführt.

100,0 mM Imidazol/HCl, pH 6,9  
1,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 mM NADP<sup>+</sup>  
1,3 mM ATP  
10–50 µl Probe  
1,0 U Glucose-6-Phosphatdehydrogenase aus Hefe.

Der Ansatz wurde 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Zucker erfolgt anschließend photometrisch durch Messung der Absorption bei 340 nm nach aufeinanderfolgender Zugabe von

1,0 Einheiten Hexokinase aus Hefe (zur Bestimmung von Glucose),  
1,0 Einheiten Phosphoglucosomerase aus Hefe (zur Bestimmung von Fructose) und  
1,0 Einheiten Invertase aus Hefe (zur Bestimmung von Saccharose).

## 11. Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität (WAK)

Zur Bestimmung der Wasseraufnahmekapazität wurde der Rückstand nach Abtrennung des löslichen Anteils durch Zentrifugation (10 min bei 10000 × g) der bei 70°C gequollenen Stärke gewogen. Die Wasseraufnahmekapazität der Stärke wurde auf die um die lösliche Masse korrigierte Stärkeeinwaage bezogen.

WAK (g/g) = (Rückstand – (Einwaage-löslicher Anteil))/(Einwaage-löslicher Anteil)



## Ausführungsbeispiele

## Beispiel 1

## Herstellung des Plasmids p35SaSSI-Hyg

Ein 1831 bp langes Asp718/XbaI-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SSS I aus Kartoffel (Abel, G., (1995) Dissertation, Freie Universität Berlin), wurde in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors zwischen die Asp718- und XbaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR-Hyg eingeführt.

## Beispiel 2

## Herstellung des Plasmids p35S-SSI-Kan

Ein 2384 bp langes EcoRI-Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für SS I aus Kartoffel, (Abel 1995, loc.cit.) wurde geglättet und in dem mit SmaI vorgeschrittenen Vektor pBinAR in "sense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors eingeführt.

## Beispiel 3

Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSII-Kan

Ein 1959 bp langes SmaI/Asp718-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS II aus Kartoffel (Abel, 1995, dort als GBSS II bezeichnet), wurde geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR eingeführt.

## Beispiel 4

## Herstellung des Plasmids pB33-SSII-Hyg

Ein 2619 bp langes SmaI/SaII Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für die SS I) aus Kartoffel (Abel, 1995, loc.cit.), wurde in den mit SmaI und SaII vorgeschrittenen Vektor pBinB33-Hyg in "sense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

## Beispiel 5

Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSSIII-Hyg

Ein 4212 bp langes Asp718/XbaI-Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für die SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, Plant J. 10 (6): 981-991), wurde in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors zwischen die Asp718- und die XbaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR-Hyg eingeführt.

## Beispiel 6

## Herstellung des Plasmids p35S-SSIII-Kan

Ein 4191 bp langes EcoRI-Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), wurde geglättet und in "sense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR eingeführt.

## Beispiel 7

Herstellung des Plasmids pB33 $\alpha$ BE $\alpha$ SSIII-Kan

Ein 1650 bp langes HindII-Fragment, welches eine partielle cDNA kodierend für das BE-Enzym aus Kartoffel enthält (Kossmann et al., 1991, Mol. & Gen. Genetics 230 (1-2): 39-44), wurde geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33 Promotors in den mit SmaI vorgeschrittenen Vektor pBinB33 eingeführt. Das erhaltene Plasmid wurde mit BamHI aufgeschnitten. In die Schnittstelle wurde ein 1362 bp langes BamHI-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für das SS III-Enzym aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

## Beispiel 8

Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSII- $\alpha$ SSIII-Kan

Ein 1546 bp langes EcoRV/HincII-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS II aus Kartoffel (Abel, 1995, loc.cit.), wurde in den EcoRV/HincII-geschnittenen Vektor pBluescript II KS kloniert und anschließend über einen Asp718/BamHI-Verdau wieder herausgeschnitten und in den ebenso verdauten Vektor pBinAR in "antisense"-Ori-

entierung bezüglich des 35S-Promotors eingefügt. Danach wurde ein 1356 bp langes BamHI-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pBinAR- $\alpha$ SSII eingeführt.

## Beispiel 9

5

Herstellung des Plasmids pB33 $\alpha$ SSI $\alpha$ SSIII-Kan

Ein 2384 bp langes EcoRI-Fragment enthaltend eine cDNA kodierend für SS I aus Kartoffel (Abel, 1995, loc.cit.) wurde geglättet und in die SmaI-Schnittstelle des pBinB33-Vektors in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors kloniert. Ein 1362 Bp langes BamIII-Fragment enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.) wurde in die BamHI-Schnittstelle des resultierenden Vektors ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

10

## Beispiel 10

15

Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSII-Hyg

Ein 1959 bp langes SmaI/Asp718-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS II (Abel, 1995, loc.cit.), wurde geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die SmaI-Schnittstelle des pBinAR-Hyg-Vektors eingeführt.

20

## Beispiel 11

## Einführung der Plasmide in das Genom von Kartoffelzellen

25

Die in Beispiel 1 bis 10 aufgeführten Plasmide wurden einzeln und/oder aufeinanderfolgend in Agrobakterien transferiert, mit deren Hilfe die Transformation von Kartoffelzellen wie oben beschrieben vorgenommen wurde. Aus den transformierten Pflanzenzellen wurden anschließend ganze Pflanzen regeneriert.

Transgene Pflanzenzellen des Genotyps asSSI-asSSII-asSSIII wurden erzeugt durch Transformation mit dem in Bsp. Nr. 1 beschriebenen Plasmid p35S $\alpha$ SSI-Hyg und anschließende Retransformation mit dem in Bsp. Nr. 8 beschriebenen Plasmid p35S $\alpha$ SSII- $\alpha$ SSIII-Kan.

30

Transgene Pflanzenzellen des Genotyps asSSII-asSSI-asSSIII wurden erzeugt durch Transformation mit dem in Bsp. Nr. 10 beschriebenen Plasmid p35S $\alpha$ SSII-Hyg und anschließende Retransformation mit dem in Bsp. Nr. 9 beschriebenen Plasmid pB33 $\alpha$ SSI $\alpha$ SSIII-Kan.

35

Als Ergebnis der Transformation synthetisierten die transgenen Kartoffelpflanzen veränderte Stärkevarietäten.

## Beispiel 12

## Physiko-chemische Charakterisierung der modifizierten Stärken

40

Die von den gemäß Beispiel 11 hergestellten transgenen Pflanzen gebildete Stärke unterscheidet sich z. B. von in Wildtyppflanzen synthetisierter Stärke in ihrem Phosphat- oder Amylosegehalt und in den mittels RVA bestimmten Viskositäten und Verkleisterungseigenschaften. Die Ergebnisse der physiko-chemischen Charakterisierung der modifizierten Stärken sind in Tabelle 1 dargestellt. In den antisense Konstrukten waren die Enzymaktivitäten der supprimierten löslichen Stärkesynthasen um bis zu 85% gegenüber den nicht transformierten Kontrollpflanzen vermindert.

45

50

55

60

65

Tabelle 1

Eigenschaften der modifizierten Stärken

Nr.	Gen typ	Phosphat (%)	Amylose (%)	RVA Max	RVA Min	RVA Fin	RVA Set	RVA T	Gelfestigkeit (%)
1	Désirée (Wildtyp)	100	100	100	100	100	100	100	100
2	asSSI	100	100	113	100	100	114	100	112
3	oeSSI	140	100	118	152	111	45	100	106
4	oeSSI	91	100	87	178	131	55	100	335
5	oeSSI	127	100	100	157	121	63	100	313
6	cosSS1	100	100	106	100	100	100	100	127
7	asSSII	55	118	76	91	95	113	98	151
8	asSSIII	197	123	82	75	76	79	95	84

Nr.	Gen typ	Phosphat (%)	Amylos (%)	RVA Max	RVA Min	RVA Fin	RVA S t	RVA T	Gelfestigkeit (%)
9	oeSSIII	100		100	100	88	87	100	68
10	cosSSIII	210		100	60	70	74	95	83
11	asBE	170	91	124	94	90	76	100	91
12	asBE-asSSIII	292		128	69	75	97	95	100
13	asSSII-asSSIII	31	124	30	77	107	229	93	212
14	asSSII-asSSIII	39	110	45	88	113	216	94	189
15	asSSI-asSSIII	115							
16	asSSII-asSSIII-asSSI								
17	asSSI-asSSII-asSSIII								
18	asSSII-asSSI-asSSIII								

Legende: SSI = Stärkesynthase Isoform I; SSII = Stärkesynthase Isoform II; SSIII = Stärkesynthase Isoform III; BE = branching enzyme; as = anti-sense; oe = überexprimiert (sense); cos = cosupprimiert (sense); Rapid Visco Analyser- (RVA)-Daten: Max = Die %-Werte sind auf den Wildtyp (= 100%) bezogen.

#### Beispiel 13

#### Charakterisierung der Seitenketten der modifizierten Stärken

Die Auftrennung der Glucanketten erfolgte nach Abtrennung der Amylose mittels der Thymol-Fällung (Tomlinson et al. loc.cit.) durch ein High-Performance-Anionenaustauscher-Chromatographie-System mit einem amperometrischen Detektor (HPEAC-PAD, Dionex). Die Proben (10 mg/ml Amylopektin) wurden in 40% DMSO gelöst und 1/10 Volumenteil 100 mM Natriumacetat pH 3,5 sowie 0,4 U Isoamylase (Megazyme) hinzugefügt. Nach Inkubation wurden 10 µl der Probe auf das Säulensystem aufgetragen und entsprechend den Angaben von Tomlinson et al. (loc. cit.) eluiert.

Die Ergebnisse der HPEAC-PAD-Analyse zur Länge und Verteilung der Seitenketten von Stärkeproben Nr. 1, 7, 8, 13 und 14 (vgl. Tabelle 1 und 2) sind in Fig. 2 dargestellt.

Ein weiteres HPLC-System zum Nachweis der Seitenkettenverteilung bestand aus 3 nacheinander geschalteten Säulen (2 TSK-Gel 2000SW und einer TSK-Gel 3000SW, Fa. TosoHaas, Stuttgart, BRD) wie von Hizukuri ((1986) Carbohydr. Res. 147: 342-347) beschrieben. 100 µl der vorbereiteten Probe wurde auf das Säulensystem aufgetragen. Als Elutionsmittel wurde 10 mM Natriumacetat pH 3,0 bei einer Flußrate von 0,35 ml/min verwendet. Die Glukane wurden mittels eines Refraktionsindexdetektors (Gynkotek) nachgewiesen, die Bestimmung der Kettenlängen der eluierten linearen Glucane erfolgte sowohl massenspektrometrisch als auch iodometrisch (Hizukuri (1986) loc.cit.).

Die Ergebnisse der gelchromatographischen HPLC-Analyse zu der Länge und Verteilung der Seitenketten der Stärkeproben Nr. 1, 7, 8, 13 und 14 (vgl. Tabelle 1 und 2) sind in Fig. 2 dargestellt.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht zu den Anteilen verschiedener Seitenketten-Fractionen der analysierten Stärken wider. Fraktion 1 repräsentiert den Anteil der A- und B1-Ketten (nach Hizukuri (1986) loc.cit.), Fraktion 2 repräsentiert den Anteil der B2-, B3- und B4-Ketten (nach Hizukuri (1986) loc.cit.) und Fraktion 3 gibt den Anteil der im Ausschlußvolumen eluierenden hochmolekularen Glukan-Moleküle an.

Tabelle 2

Verteilung der Seitenketten des Amylopektins der modifizierten Stärke

Nr.	Genotyp	Fraktion 1 (%)	Fraktion 2 (%)	Fraktion 3 (%)
1	Désirée (Wildtyp)	58,7	40,3	1,0
7	asSSII	62,6	36,5	0,9
8	asSSIII	72,4	26,3	1,3
13	asSSIIasSSIII	66,9	27,5	5,6
14	asSSIIasSSIII	61,5	35,1	3,4

## Patentansprüche

## 1. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, enthaltend

- a) eine Nukleotidsequenz codierend für ein Protein mit der Funktion einer löslichen Stärkesynthase III oder Teile besagter Nucleotidsequenz und
- b) ein oder mehrere Nucleotidsequenzen, die für ein Protein kodieren, ausgewählt aus der Gruppe A, bestehend aus Proteinen mit der Funktion von Verzweigungsenzymen, ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen, löslichen Stärkesynthasen, Entzweigungsenzymen, Disproportionierungsenzymen, plastidären Stärkephosphorylasen, R1-Enzymen, Amylasen, Glukosidasen, Teilen besagter Nukleotidsequenzen codierend für Proteine ausgewählt aus der Gruppe A.

2. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein Desoxyribonukleinsäure-Molekül ist.

3. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2, das ein cDNA-Molekül ist.

4. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein Ribonukleinsäure-Molekül ist.

5. Nukleinsäuremolekül, das mit einem Nukleinsäuremolekül einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert, vorzugsweise spezifisch hybridisiert.

6. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5.

7. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidsequenz codierend für ein Protein mit der Funktion einer löslichen Stärkesynthase III oder Teile davon in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.

8. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidsequenz codierend für ein oder mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A oder Teile davon in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.

9. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidsequenz codierend für ein oder mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A teilweise in sense-Richtung und teilweise in anti-sense-Richtung vorliegt.

10. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß es mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Synthese einer RNA, die ggf. translatierbar ist, in einer pro- oder eukaryontischen Zelle gewährleisten.

11. Wirtszelle, die mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-5 oder einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 6-10 transformiert ist oder von einer solchen Zelle abstammt.

12. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, dadurch gekennzeichnet, daß ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-5, oder ein Vektors nach Anspruch 6-10 in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird.

13. Pflanzenzelle, erhältlich nach einem Verfahren gemäß Anspruch 12.

14. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, dadurch gekennzeichnet, daß aus einer Zelle nach Anspruch 13 eine vollständige Pflanze regeneriert wird.

15. Pflanze, enthaltend eine Pflanzenzelle nach Anspruch 12.

16. Pflanze nach Anspruch 15, die eine Nutzpflanze ist.

17. Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 16, die eine stärke-speichernde Pflanze ist.

18. Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 17, die eine Weizen-, Mais-, Kartoffel- oder Reis-pflanze ist.

19. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 18.

20. Verfahren zur Herstellung von Stärke nach einem an sich bekannten Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß Pflanzenzellen gemäß Anspruch 13, Pflanzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 18 oder Vermehrungsmaterial nach Anspruch 19 in das Verfahren integriert werden.

21. Stärke, erhältlich aus einer Zelle gemäß Anspruch 13, einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 18, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 19 oder einem Verfahren nach Anspruch 20.

22. Stärke nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen im Vergleich zu einer Stärke, die aus einer nicht transformierten Zelle oder Pflanze erhältlich ist, einen um mindestens 30% verminderten Phosphatgehalt aufweist und daß ihr Glukan-Anteil nach Isoamylase-Behandlung im Ausschlußvolumen eines HPLC-Säulensystems bestehend aus 2 nacheinandergeschalteten TSK-Gel 2000SW-Säulen und einer TSK-Gel 3000SW-Säule in 10 mM Natriumacetat pH 3,0 um mindestens 50% erhöht ist. 5
23. Stärke nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen im Vergleich zu einer Stärke, die aus einer nicht-transformierten Zelle oder Pflanze erhältlich ist, einen um mindestens 10% erhöhten Phosphatgehalt aufweist und daß ihr Glukan-Anteil nach Isoamylase-Behandlung im Ausschlußvolumen eines HPLC-Säulensystems bestehend aus 2 nacheinandergeschalteten TSK-Gel 2000SW-Säulen und einer TSK-Gel 3000SW-Säule in 10 mM Natriumacetat pH 3,0 um mindestens 50% erhöht ist. 10
24. Verwendung der Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 21–23 im industriellen Bereich, vorzugsweise zur Herstellung von Lebensmitteln, Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.
25. Verwendung von Nukleinsäuremolekülen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1–5 oder Vektoren nach einem oder mehreren der Ansprüche 6–10 zur Herstellung von transgenen Zellen, vorzugsweise bakteriellen oder pflanzlichen Zellen. 15
26. Verwendung von Pflanzenzellen gemäß Anspruch 13, Pflanzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 15 bis 18 oder Vermehrungsmaterial nach Anspruch 19 zur Herstellung von Stärke.

---

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

---

Fig. 1

# RVA-Profil

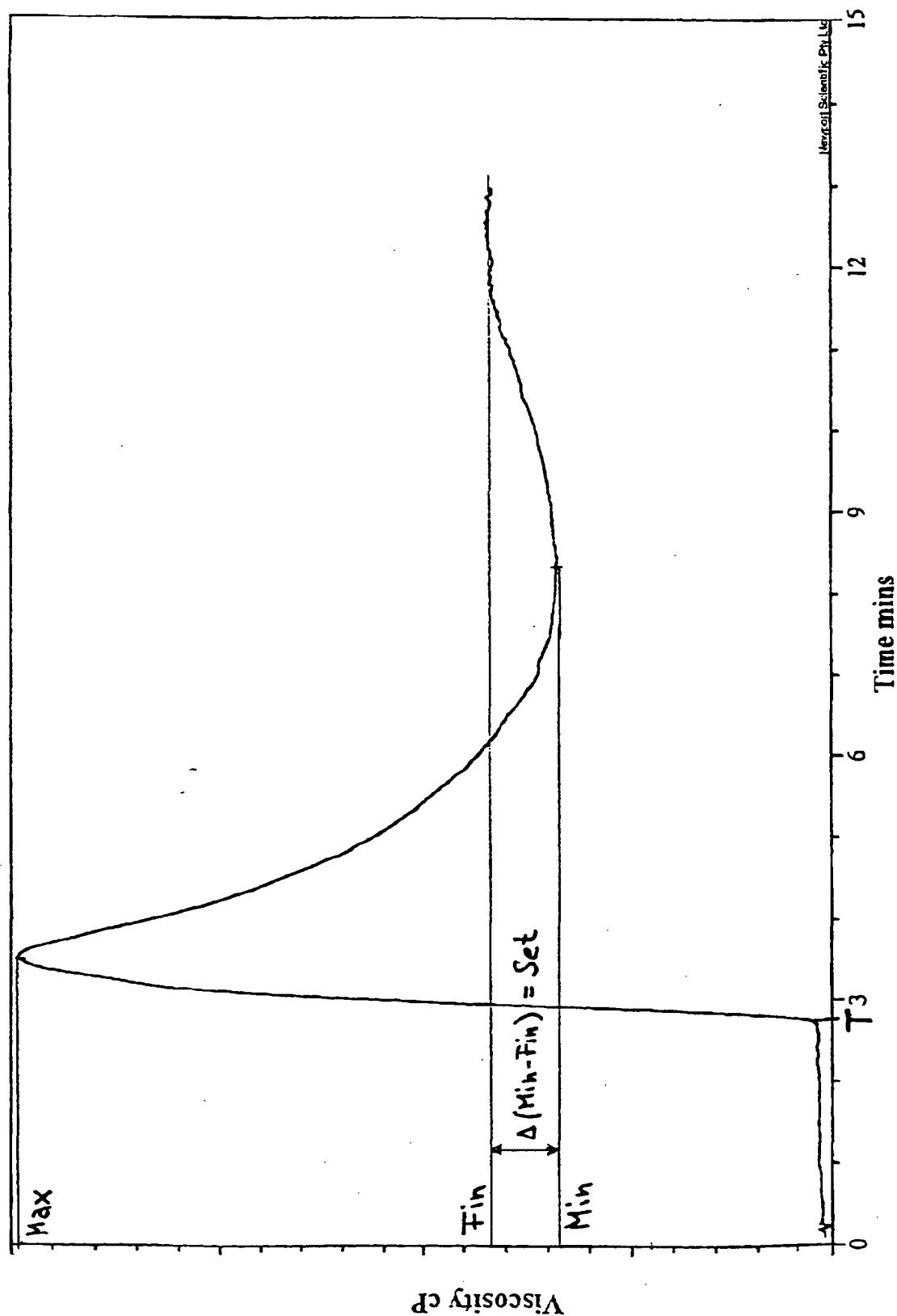




Fig. 2A

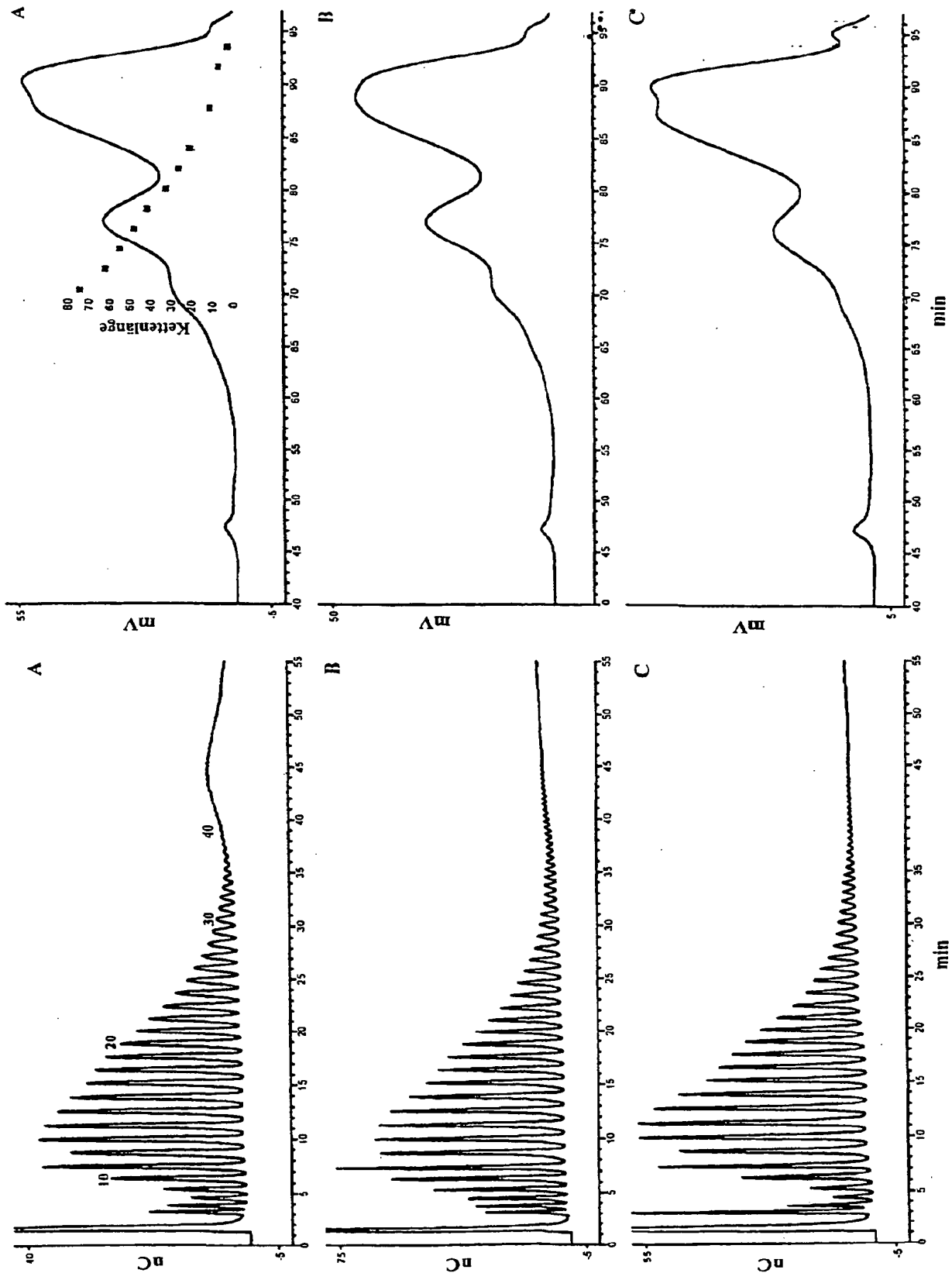


Fig. 2B

